

转座子 Tn5096 对刺孢吸水链霉菌北京变种 RF220 转座的诱变*

张应禄 朱昌雄** 白兰芳 王以光

(中国协和医科大学中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(**中国农业科学院生物防治研究所 北京 100081)

提 要 用大肠杆菌/链霉菌穿梭质粒 pCZA168(*bla*, *tsr*, Tn5096, ColEI rep, Strep rep^{ts})多次转化农抗 120 产生菌刺孢吸水链霉菌北京变种(*S. Streptomyces hygrospinosus* var. *beijingensis*) RF220 的原生质体,均未得到转化子。来自吸水链霉菌应城变种(*S. Streptomyces hygroscopicus* var.)10-22 突变株的链霉菌质粒 pIJ702(*tsr mel*⁺)可以转化 RF220,但转化频率只有数十个转化子/ μ gDNA。用来自 RF220 本身的 pIJ702 对消除 pIJ702 后的 RF220 的原生质体进行了再转化,转化率没有明显的提高。用氨基青霉素和甘氨酸协同处理 RF220 的菌丝体,并经 -70℃ 冷冻原生质体再转化,得到了 4 个 pCZA168 的转化子。质粒提取、酶切、抗性测定表明 4 个转化子中 pCZA168 中大肠杆菌 DNA 部分均被切除,成为大小约 5.0~6.0kb 的小质粒,命名为 pWZH102(*tsr*, Tn5096, strep rep^{ts})。用 pWZH102 上的转座子 Tn5096 对 RF220 进行转座实验,在 168 个转座个体中,有 2 株可能为抗生素生物合成阻断变株,另有产生抗生素水平各异的变株,说明 Tn5096 的转座可以引起表型的不同变化。

关键词 限制修饰系统,吸水链霉菌,转座子

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)06-0510-14

刺孢吸水链霉菌北京变种 RF220 产生农用抗生素 120,主要用于防治农作物、果树真菌病害。农抗 120 属于以胞嘧啶己糖醛酸为基本结构骨架的核苷类抗生素,本工作拟用链霉菌转座子 Tn5096 获取生物合成阻断变株,以研究其生物合成基因。

在研究中发现 RF220 链霉菌对外源 DNA 具有比较强的限制性障碍。本文报道初步克服 RF220 链霉菌对外源 DNA 的限制性障碍,将携带有转座子 Tn5096 的质粒 pCZA168 导入 RF220 菌株的途径和 Tn5096 在 RF220 中的转座。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

刺孢吸水链霉菌北京变种(*S. hygrospinosus* var. *beijingensis*) RF220 和农抗 120 鉴定菌由中国农业科学院生物防治研究所谢德龄研究员提供。吸水链霉菌应城变种 10-22 抗生素生物合成阻断变株 N-103^[1],以及来源于该变株的链霉菌质粒 pIJ702(*mel*⁺, *tsr*)^[1]由华中农业大学邓子新教授提供。质粒 pCZA168^[2](*bla*, *tsr*, Tn5096, ColEI rep, strep rep^{ts})由美国 C. R. Hutchison 教授提供。

1.2 培养基

1.2.1 CM 培养基^[3]为 RF220 的产孢培养基。

* 本研究为国家自然科学基金资助项目(No. 39470010)

收稿日期:1998-02-26,修回日期:1998-04-20

1.2.2 SR12 为原生质体再生和转化的培养基:玉米浆 10g,可溶性淀粉 15g,Sucrose 103g, KH_2PO_4 2g, MgSO_4 0.25g, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4g, CaCO_3 1g,琼脂 15g,定容至 1L。

1.2.3 液体培养基 YEME^[3](蔗糖浓度为 10%)

1.2.4 消除 pIJ702 前后 RF220 的产黑色素分离培养基为 R2YE^[3]。

1.2.5 RF220 发酵培养基:玉米粉 10g,可溶性淀粉 20g,黄豆饼粉 2.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3g,NaCl 3g, KH_2PO_4 0.2g, CaCO_3 4g,定容至 1L。

1.2.6 检定培养基:马铃薯,蔗糖培养基(马铃薯去皮 200 g 蔗糖 20 g,琼脂 15g,定容 1000mL)pH7.5, 1.0×10^5 Pa 灭菌 20min。

1.3 方法

1.3.1 链霉菌原生质体制备、转化、及质粒 DNA 提取等常规方法均参照文献^[3,4]。

1.3.2 从 RF220 中提取 pWZH102 的方法是在 YEME 培养的菌丝体 -20℃ 冷冻数周,然后应用碱性裂解法^[3]。

1.3.3 从 RF220 中消除 pIJ702 的方法是在松弛两轮选择压力的情况下传代,以 pIJ702 质粒中含有的黑色素基因为指标,孢子群体中在 R2YE 培养基上长成白色菌落的即为消除了 pIJ702 的个体,没有消除的呈黑色菌落。

1.3.4 Tn5096 在 RF220 中转座的方法是将含有 pWZH102 的 RF220 孢子悬液稀释到一定浓度,均匀涂布于含阿普霉素(Am25μg/mL)的 CM 平板上,29℃ 培养 72h,接着在 39℃ 培养 15~16d,在原菌落上分化形成的扇形菌落(sector)即为发生了转座的个体。

1.3.5 RF220 菌株及转座突变株的发酵:从 CM 培养基培养的菌种挖块培养基接种于 50mL/250mL 三角瓶 RF220 发酵培养基中,每株三瓶,28℃ 摇床培养(转速 220r/min),60h 取样检定。

1.3.6 农抗 120 的生物检定:标准曲线法。每 100mL 培养基加 1mL 清酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)AS2.14(用无菌水制成 50%透光率的菌悬液)。每培养皿(直径 9cm)加 15mL 培养基,发酵液用水稀释,每个发酵液样品加 6 个牛津杯,培养皿置 30℃ 培养 14~16h,以 120 标准品作为对照,量取抑菌圈直径,取平均值,从标准曲线获得发酵液效价单位。

2 结果

2.1 刺孢吸水链霉菌对外源 DNA 有强的限制性障碍

pCZA168 是大肠杆菌-链霉菌穿梭质粒。为建立 RF220 对外源质粒 DNA 的转化系统,多次用多于 1μg 的 pCZA168DNA 转化 RF220 的原生质体,均未得到转化子。已知弗氏链霉菌的某些菌株具有多种限制-修饰系统^[5],但 pIJ702 可以以较低的频率转化某些菌种。覃重军等^[1]来自自变铅青链霉菌 TK24 的质粒 pIJ702 转化吸水链霉菌应城变种 10-22,没有得到转化子,但改来自弗氏链霉菌 ATCC10745 的 pIJ702 转化,得到了转化子,转化频率为 $10^3 \sim 10^4$ 转化子/μgDNA。N-103 是 10-22 的抗生素生物合成阻断变株,用 pIJ702 转化 N-103 原生质体的情形与 10-22 相似^[1]。从 N-103 中提取 pIJ702,转化 RF220,能够得到转化子,但转化频率只有数 10 个转化子/μgDNA,用来自 RF220 本身的 pIJ702 再转化消除 pIJ702 后的 RF220 的原生质体,转化率没有明显的提高。nCZA168

再转化消除 pIJ702 后的 RF220 的原生质体也没有得到转化子,说明 RF220 中存在着对外源 DNA 不同于弗氏链霉菌的限制性。pIJ702 在 10-22 中不能正常表达黑色素基因^[1],而在 RF220 中能稳定表达,但表达受培养基成份的影响,RF220 转化子在 SR12 等培养基上不产生黑色素,在 R2YE 等培养基上产生黑色素。

2.2 RF220 中质粒 pCZA168 转化子的获得及转化子中质粒的鉴定

青霉素与甘氨酸共同作用,能提高谷氨酸产生菌天津短杆菌(*Brevibacterium tianjinense*)T6-13 和北京棒杆菌(*Corynebacterium pекinense*)对溶菌酶的敏感性^[6]。为了提高 RF220 细胞壁对溶菌酶的敏感性,在含有 0.5% 甘氨酸及 90μg/mL Ap 的 YEME 培养基制备消除 pIJ702 的 RF220 原生质体,并经 -70℃ 冷冻后,转化质粒 pCZA168,可以得到转化子,从 pCZA168 的转化子中提取质粒,电泳检测明显比 pCZA168 小,EcoRV 酶切表明大小约 5.0~6.0kb(见图 1)。将该质粒命名为 pWZH102(*tsr*,Tn5096,*strept rep^{ts}*)。

用 pWZH102 对大肠杆菌 DH5α 的感受态细胞进行了三次转化,结果都没有得到转化子,而 pCZA168 作为对照每次都能得到转化子,表明 pWZH102 的大肠杆菌复制子部分很可能缺失了。进一步的酶切分析表明,pWZH102 同 pCZA168 一样有两个 *Hind* III 酶切位点,但只有一个 *Eco*RI 位点。质粒 pWZH102 酶切图谱见图 2。

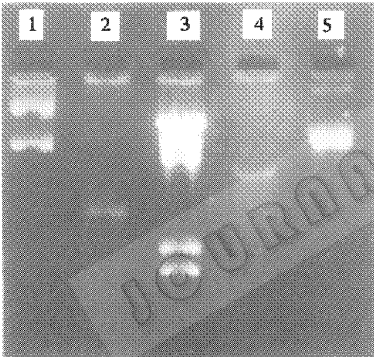


图 1 质粒 pWZH102 的 *Eco*RV 酶切分析

Fig. 1 Enzyme digestion of plasmid pWZH102 with *Eco*RV

1. pCZA 168 ; 2. pWZH102 3. λ DNA/*Hind* III ;
4. pWZH102/*Eco*RV 5. pCZA168/*Eco*RV.

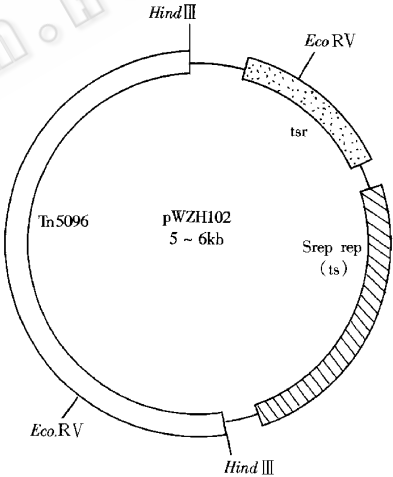


图 2 质粒 pWZH102 酶切图谱

Fig. 2 Restriction map of plasmid pWZH102

pCZA168 是温敏型质粒,将 RF220(pWZH102)的孢子悬液稀释至一定浓度,涂布于 CM 平板(Thio 20μg/mL)上,分别置 29℃、39℃ 培养,在 29℃ 的平皿 48h 内即可见明显的菌落,而在 39℃ 连续培养 8d 没有出现菌落,说明 pWZH102 也是温敏型质粒。

Tn5096 的标记基因是 *Am^r* 基因,*Am* 抗性实验显示:最初得到的含 pWZH102 的 RF220 只有约 1/400 的个体具有 *Am* 抗性,经第二轮复筛,大部分 *Am^r* 基因的表达趋于稳定。上述全部实验表明,pCZA168 进入 RF220 后被切除了大肠杆菌部分,而保留了来源于链霉菌的部分,成为 pWZH102。用 pCZA168 转化变铅青链霉菌(*S. lividans*)

TK24 提取质粒 ,电泳检测大小并没有变化 ,说明 pCZA168 在 RF220 中的变化是由于 RF220 对外源 DNA 的限制修饰造成的。

2.3 Tn5096 在 RF220 中的转座。

质粒 pWZH102 的复制子是温敏型的链霉菌复制子 ,在 34℃ 以下时自主复制 ,在 39℃ 高温时停止自主复制。RF220 对 Am 敏感 ,在 Am 选择压力下 ,39℃ 高温时只有染色体 DNA 上整合有 Tn5096 的个体 ,由于 Tn5096 携带的 Am^r 基因的表达才能继续生长 ,将 RF220(pWZH102)转化子的孢子悬液 ,涂布于 CM 平板(Am25μg/mL)上 ,28℃ 培养 72h ,然后在 39℃ 培养 15~16d ,形成的原菌落上长成肉眼可见的扇形菌落(sector)。挑种 sectors 在 Am 平板上 ,39℃ 培养进一步消除自主复制的 pWZH102 ,并进行纯化分离 ,获得 168 株带有转座子的菌株。

168 个转座子 Tn5096 插入突变体菌株的发酵检测结果表明 这些菌株产抗水平有一定差别 ,2 株可能为农抗 120 生物合成完全阻断变株 ,5 株 120 生物合成受到明显干扰 ,另有 9 株产 120 水平有一定提高。发酵实验重复三次总结果见表 1。由表中结果可见 Tn5096 在 RF220 中的转座对农抗 120 的生物合成产生了不同的影响。

3 讨论

转座子阻断法是近几年发展起来的一种克隆目的基因的方法 ,从细菌到高等植物都有广泛的应用。利用转座子阻断法进行遗传分析的策略 ,是首先根据转座子转座造成靶点基因的失活引起的表型的变化选择到目的基因 ,然后根据转座子携带的标记基因定向克隆而获取与转座子相邻的目的基因片段。转座子转座位点明确 ,标记易于识别 ,某些转座子有较高的转座随机性 ,从而为各种突变体的筛选开拓了理想的途径。

pCZA168 导入 RF220 多次转化都没有成功。pIJ702 的转化、消除、再转化实验结果表明 :RF220 对外源 DNA 的限制性障碍是复杂的。青霉素和甘氨酸协同处理 RF220 的菌丝体 ,可提高原生质体的形成率 ,但只有在 -70℃ 冷冻原生质体数天后再转化 ,才得到了少量转化子。冷冻对细胞的物理作用是肯定的 ,但与 RF220 对外源 DNA 的限制性障碍有什么关系还不清楚。pCZA168 进入 RF220 后质粒上的大肠杆菌 DNA 部分被切除 ,推测 RF220 中可能含有针对非链霉菌 DNA 的限制性酶 ,该酶很可能是 pCZA168 转化 RF220 的最大限制性障碍。由于该酶对 pCZA168 上大肠杆菌 DNA 的破坏作用 ,使得 pCZA168 进入 RF220 后极不稳定 ,质粒的复制、tsr 基因的表达、表达的量都受到限制 ,使绝大多数细胞不具备足够的抗性 ,在 Thio 的选择压力下死亡 ,只有极少的细胞中 ,pCZA168 经受破坏后很快环化成为完整的质粒 ,才能生存下来 ,成为平板上可见的转化子。

一般转座子的转座具有“区域优先”(region preference) ,Tn5096 对转座位点也有一定的要求^[7]。本文对转座实验得到的 sectors 的产抗测定初步结果表明 :Tn5096 转座在

表 1 120 转座突变菌株的发酵检测结果

Table 1 The results of fermentation of 120 mutants with transposon

发酵效价变化幅度	菌株数	所占比例 %
Variation of fermentation title	Number of strain	Proportion
>150 %	2	1.2
125~150 %	2	1.2
100~125 %	5	3.0
75~100 %	25	14.9
50~75 %	91	54.2
25~50 %	36	21.4
<25 %	5	3.0
0	2	1.2
100%(对照)		

RF220 染色体 DNA 不同的位点上。准确的结论只有测定转座位点处的序列后才能提出,分离鉴定不同转座位点处靶基因的结构和功能,对 RF220 抗生素的生物合成和表达调控将会有深入的了解。

参 考 文 献

- [1] 覃重军,邓子新,周启等.遗传学报,1993,22(2):180~184.
- [2] Solenberg P J, Baltz R H. *Bacteriology*, 1991, 173(3):1096~1104.
- [3] Hopwood D A, Bibb M J, Chater K F *et al.* In *Genetic Manipulation of Streptomyces-A laboratory Manual*, The John Innes Foundation, Norwich, England, 1985.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. In *Molecular Cloning-A laboratory Manual*, 2nd. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Baltz R H, Hahn D R, Henney M A *et al.* *Gene*, 1992, 115: 61~65.
- [6] 王淑华,王恒新,李而炆.微生物学杂志,1991,60~63.
- [7] Solenberg P J, Baltz R H. *Gene*, 1994, 147: 47~54.

TRANSPOSITION OF Tn5096 IN A AGRICULTURAL ANTIBIOTIC 120 PRODUCER *STREPTOMYCES HYGROSPINOCUS* VAR. *BEIJINGENSIS* RF220

Zhang Yinglu Zhu Changxiong* Bai Lanfang Wang Yiguang

(Institute of Medicinal Biotechnology, CAMS&PUMC, Beijing 100050)

(*Institute of Biological Protection, CAAS, Beijing 100081)

Abstract No transformant was obtained when pCZA168(*bla*, *tsr*, Tn5096, ColEI rep. Strep rep^{ts}) was used to transform *S. hygrospinocus* RF220. pIJ702 isolated from *S. hygroscopicus* N103 was transformed into RF220 at a low frequency. pIJ702 plasmid was cured in RF220 transformant and it was re-transformed into its cured FR220 strain, but the transformation frequency was not increased significantly, suggesting that restriction-modification system in FR220 was existent and complicated. Four transformants containing pCZA168 were obtained, when the RF220 strain was grown in medium with ampicillin, glycine and the protoplast was stored at -70°C . Restriction analysis of plasmid from transformants indicated that the DNA fragment from *E. coli* in pCZA168 was deleted. With transposition of Tn5096, two mutants blocked in antibiotic biosynthesis of 120 and some mutants with variation in antibiotic level were obtained, this showed that the Tn5096 transposed in different positions of chromosomal DNA in RF220 and resulted in the production of 120 in different level.

Key words Restriction-modification system, *Streptomyces hygrospinocus*, Transposon Tn5096

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39470010)